Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. H. E. Bock

Darstellung der Amyloidfibrillen

Untersuchungen über deren Zusammensetzung und deren antigene Wirksamkeit

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Dieter Ulitzsch
aus Halle

1969

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543901_0064

Aus der Medizinischen Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. H. E. Bock

Darstellung der Amyloidfibrillen

Untersuchungen über deren Zusammensetzung und deren antigene Wirksamkeit

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Dieter Ulitzsch
aus Halle

1969

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. J. Hirschmann

1. Berichterstatter: Professor Dr. H.P. Mißmahl
2. Berichterstatter: Professor Dr. H.E. Bock

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v.Spangenberg KG • Tübingen

Meinen Eltern gewidmet

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I.	EINLEITUNG	1
	1. Über die Struktur des Amyloids	1
	2. Über die Genese des Amyloids	3
	3. Klinische Untersuchungen mit gereinigten Amyloidfibrillen	6
II.	MATERIAL UND METHODEN	7
	1. Isolierung der Amyloidfibrillen ...	7
	2. Reinigung der rohen Amyloidfibrillen	8
	3. Angewandte Methoden zur Prüfung der Amyloidfibrillen auf Reinheit	11
	a) Polarisationsmikroskopie	11
	b) Elektronenmikroskopie	11
	4. Weitere Verwendung der gereinigten Amyloidfibrillen	11
	a) Klinische Untersuchung	11
	b) Biochemische Untersuchungen	12
III.	ERGEBNISSE UND DISKUSSION	13
	1. Prüfung des Amyloidgehaltes der Ober- und Unterschicht	13
	2. Prüfung der Reinigungsschritte des Amyloids im Zuckergradienten	13
	3. Problematik der Reinheit der Amyloidfibrillen und Vergleich der Aminosäurenanalyse verschiedener Autoren mit den eigenen Werten	14
	4. Ergebnisse der Inkubation der Amyloidfibrillen mit Kollagenase	17
	5. Ergebnisse der klinischen Untersuchungen mit Amyloidfibrillen	20
IV.	ZUSAMMENFASSUNG	24
V.	LITERATURVERZEICHNIS	25

I. EINLEITUNG

1. Über die Struktur des Amyloids

Der Begriff AMYLOID wurde von Rudolf Virchow geprägt. Er sollte auf die färberische Ähnlichkeit dieser Substanz mit Stärke (Amylum) hinweisen. Stärke wird durch Lugol'sche Lösung (Jod und Kaliumjodid in Wasser) blau gefärbt, während Amyloid einen braunen Farbton annimmt, der aber bei Zusatz von Schwefelsäure in blau umschlägt. Demzufolge hielt Virchow Amyloid für einen kohlenhydratartigen Stoff ("tierische Zellulose") (26).

Im Jahre 1859 wiesen dann FRIEDREICH und KÉKULÉ (6) den Eiweißcharakter des Amyloids nach, dessen elementare Zusammensetzung sie wie folgt bestimmten: C = 53, 58, H = 7,00, N = 15,04. Sie schlossen daraus, daß "die Amyloidsubstanz aller Wahrscheinlichkeit nach, nur eigentümlich modifizierte und veränderte eiweißartige Materie sei". Ihre Befunde wurden 1865 von KÜHNE und RUDNEFF (9) bestätigt.

Später fanden einige Autoren im Amyloid Mucopolysaccharide; teilweise nahmen sie sogar an, es bestünde zum größten Teil daraus (8, 20).

In fast allen bis heute erschienenen Arbeiten wird darauf hingewiesen, daß Amyloid Kohlenhydrat enthalte und somit ein Glycoprotein sei (COHEN (3).

Als COHEN und CALKINS 1959 (5) die faserige Natur des Amyloids elektronenmikroskopisch nachweisen konnten und ihnen (4) im Jahre 1964 die Reindarstellung der Amyloidfibrillen gelang, war ein entscheidender Schritt zur genauen biochemischen Analyse des Amyloids getan. 1966 ging COHEN (3) in einer "vorläufigen chemischen Analyse teilweise gereinigter Amyloidfibrillen" auf die Frage der Struktur des Amyloids ein.

Er konnte durch eine Aminosäurenanalyse und durch Enzymstudien nachweisen, daß die fibrilläre Struktur des Amyloids in keinem Zusammenhang zu Kollagen steht, was wegen der beiden Fibrillen eigentümlichen Doppelbrechung zu erwägen gewesen wäre.
COHEN (3) fand bei Aminosäurenanalysen seiner gereinigten Amyloidfibrillen 4,62 g Prolin/100 g und 5,59 g Glycin/100 g, während er Hydroxyprolin nicht nachweisen konnte. Die geringen Mengen an Prolin und Glycin, sowie das Fehlen von Hydroxyprolin sprechen gegen eine chemische Beziehung zu Kollagen, das hauptsächlich aus diesen drei Aminosäuren besteht. (23). Unterstützt wurde dieses Ergebnis durch den negativen Ausfall der Enzymstudien: eine Inkubation der gereinigten Amyloidfibrillen mit Kollagenase ergab keine Veränderung der Fibrillen, die nach verschieden langer Kollagenaseeinwirkung elektronenmikroskopisch untersucht wurden (COHEN und CALKINS 4).

Da nach der Methode von COHEN (4) eine absolute Reindarstellung der Amyloidfibrillen noch nicht möglich ist, ergibt sich die Frage, ob der genannte Gehalt an Prolin und Glycin einen bestimmten Anteil dieser Aminosäuren im Amyloid wiedergibt oder ob er durch Verunreinigungen, z.B. durch Kollagen zustande kommt.

Es soll versucht werden, diese Frage in der vorliegenden Arbeit zu beantworten. Ebenso soll durch eine Aminosäurenanalyse versucht werden, Hydroxyprolin nachzuweisen.

Die verschieden großen Anteile an Mucopolysacchariden im Amyloid, die bei Strukturanalysen des Amyloids von den Autoren nachgewiesen wurden, erklärt sich COHEN (3) mit der Annahme, daß den meisten Untersuchern keine gereinigten Amyloidfibrillen zur Verfügung standen und deshalb diese Stoffe aus der mucopolysaccharidreichen Grundsubstanz, in die die Fibrillen eingebettet sind, bestimmt wurden.

Er fand minimale Beträge (0,67 % des Trockengewichtes) an uronsäurehaltigen Substanzen. Über ähnliche Ergebnisse berichteten PIRANI u. Mitarbeiter (21) (0,3 - 0,4 % des Trockengewichtes). COHEN (3) hält es deshalb für wahrscheinlich, daß die Amyloidfibrillen keine Mucopolysaccharide enthalten und die geringen nachgewiesenen Mengen aus Verunreinigungen durch Grundsubstanz stammen.

Die Kohlenhydratanteile im Amyloid, die COHEN (3) fand, sind gering: 3,0 - 4,6 % des Trockengewichtes, je nach Reinigungsart der Amyloidfibrillen. Das harnstoffisolierte Amyloid, daß BENDITT und Mitarbeiter (2) untersuchten, enthielt 1 - 3,6 % Kohlenhydrate; Werte also, die den von COHEN gefundenen, ähnlich sind.

2. Über die Genese des Amyloids

Virchow war der Ansicht, das Cytoplasma der Zelle würde sich in Amyloid umwandeln und so ein Ausdruck der Zelldegeneration sein (26).

ODDI (20), der 1894 Chondroitinschwefelsäure im Amyloid nachgewiesen hatte, glaubte die Entstehung des Amyloids über eine nutritive Reizung der Zelle durch die Chondroitinschwefelsäure erklären zu können.

Versuche mit Leukozyteneiweiß und -antikörpern, die LOESCHKE (14) 1927 durchführte, bildeten die Grundlage für eine auch heute noch vertretene Theorie der Amyloidgenese (= Infiltrationstheorie, die eine Infiltration eines Antigen-Antikörper-Komplexes, den das Amyloid darstellen soll, bzw. eine Infiltration des Antigens und Praecipitation in das Gewebe fordert). LOESCHKE ging davon aus, daß arteigene Proteine unter Umständen antigene Eigenschaften annehmen könnten. Durch eine Resorption von körpereigenem Eiter oder

durch intravasalen Zerfall von Leukozyten nach parenteraler Gabe bestimmter Reizkörper solle es zur Antikörperbildung kommen. Die Reaktion zwischen beiden führe dann zum Amyloid, das also als Leukozytenpräcipitin aufzufassen sei. Eine Amyloidose habe eine besonders hohe Sensibilisierung gegen Leukozyteneiweiß und einen großen Überschuß an Antigen im Blut zur Voraussetzung.

LETTERER (11) erweiterte 1934 die Vorstellungen LOESCHKES indem er zeigte, daß nicht nur Leukozyten eine spezifische Bedeutung für die Antigenbildung zukommt, sondern ganz allgemein eingeschmolzenem körpereigenem Eiweiß (Extrakte aus Leber-, Milz- und Muskeleiweiß).

Aus der von ihm angenommenen nahen chemischen Verwandtschaft der Amyloidsubstanz mit den Serumglobulinen und aus experimentellen Befunden hatte LETTERER schon 1925 geschlossen, daß "eines der ursächlichen Hauptmomente zur Amyloidentstehung in der Globulinvermehrung zu suchen sei, die als begleitendes Symptom fast allen Grundkrankheiten des Amyloids eigen ist und außerdem zu den Folgeerscheinungen der amyloiderzeugenden Mittel des Experimentes gehört". (zit. nach LETTERER 11).

Eine grundsätzlich andere Erklärung zur Pathogenese des Amyloids gab TEILUM 1964 (25). Nach seinen Untersuchungen kommt es zu Beginn der Amyloidose zu einer Vermehrung von pyroninophilen RE-Zellen und Plasmazellen. Diese Zellen produzieren normalerweise auf einen antigenen Reiz hin, Immunglobuline. Bei dauernder Stimulation dieser Zellen, die zu einer erhöhten Globulinproduktion führt, kann es zu einer Dysfunktion, d.h. zur Amyloidproduktion kommen. Nach dieser Anschauung ist also Amyolid als ein fehlgebildetes Zellprodukt anzusehen, das von durch dauernde Stimulation erschöpften Zellen gebildet und sezerniert wird.

Diese Sekretionstheorie postuliert Amyloidproduktion in

mesenchymalen Zellen und extrazelluläre Ablagerung des Amyloids in Fibrillenform ähnlich dem Kollagen, entlang den schon vorhandenen Kollagen- und Reticulinfasern (18). Als amyloidproduzierende Zellen gelten:

1) Eiweiß- und/oder mucopolysaccharidproduziernde Zellen des RE-Systems.
2) Fibroblasten.
3) Ortsständige Plasmazellen (18).

Damit läßt sich auch die von MISSMAHL (15) gefundene Unterteilung in perikollagenes und periretikuläres Amyloid erklären: Eine normalerweise retikulinbildende Zelle führt zu periretikulärer Amyloidablagerung, eine normalerweise kollagenbildende Zelle dagegen zu perikollagener Amyloidablagerung. Dieselbe Dysfunktion der amyloidproduzierenden Zellen aufgrund eines genetischen Defektes nimmt MISSMAHL (18) auch für die vererbte periretikuläre Amyloidose (=familiäres Mittelmeerfieber) an, die besonders häufig bei den aus dem Mittelmeergebiet stammenden Juden und Armeniern vorkommt (17).

Eine Nachahmung dieses genetischen Defektes im Sinne einer Phänokopie könnte auch die sogenannte idiopatische Amyloidose (=Amyloidose ohne erkennbare Grundkrankheit) erklären (18).

Mit Hilfe der Sekretionstheorie lassen sich alle bisher unklaren Befunde gut deuten. Als Beispiele seien angeführt:

1) Hauttransplantate werden von amyloidkranken Mäusen später abgestoßen als von gesunden (22).
2) Die gleichzeitig mit Amyloidose vielfach nachgewiesenen Veränderungen des Serumeiweißkörpers kommen durch die Stimulation der RE-Zellen zustande, wobei
   a) die amyloiderzeugenden RE-Zellen zur Amyloidproduktion,
   b) andere RE-Zellen zur Bildung anderer Paraproteine angeregt werden (18).

Sowohl die Serumeiweißveränderungen, als auch die Immunsuppression sind damit nicht kausal an der Amyloidbildung beteiligt, sondern nur Begleiterscheinungen (18).

Die Sekretionstheorie läßt auch folgende mit der Infiltrationstheorie schwer zu erklärende Tatsachen verständlich erscheinen:

1) Die Lokalisation des Amyloids außerhalb der Gefäßbahn.
2) Die fibrilläre Struktur des Amyloids, die gegen einen Antigen-Antikörperkomplex spricht.
3) Parabiose versuche mit Mäusen die LINKE (13) auf Veranlassung LETTERERsdurchführte.
   LINKE untersuchte 59 Paare homozygoter Tiere eines reinen Inzuchtstammes (C 57 BL) in Parabiose.
   Der Blutdurchfluß an der Verbindungsstelle wurde mit Cr^{51} markierten Erythrocyten gemessen. Er betrug ein 5-faches der Gesamtblutmenge in 24 Stunden.
   An einem Parabionten wurde mit Casein und Adjuvans eine Amyloidose erzeugt, am anderen jedoch nicht.
   Es stellte sich dabei heraus, daß die Amyloidose auf humoralem Weg nicht übertragen werden kann, da der zweite Parabiont nicht an Amyloidose erkrankte.

3. Klinische Untersuchungen mit gereinigten Amyloidfibrillen.

Es wurde bisher nicht untersucht, wie Menschen auf zugeführtes Fremdamyloid reagieren. Die Methode von Cohen, Amyloidfibrillen in hochgradig gereinigter Form darzustellen, gab den Anlaß, dies zu untersuchen, ohne Störungen der evtl. auftretenden Reaktionen durch verunreinigende Substanzen erwarten zu müssen. In einer klinischen Untersuchungsreihe an 54 Patienten und Testpersonen wurde die Reaktion auf intracutan injiziertes Fremdamyloid geprüft.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Isolierung der Amyloidfibrillen

Die Amyloidfibrillen wurden nach der von COHEN und CALKINS (4) angegebenen Methode aus der Milz eines Patienten mit ausgedehnter perireticulärer generalisierter Amyloidose gewonnen.
Die Milz wurde bis zur Aufarbeitung bei einer Temperatur von - 18 °C im Tiefkühlschrank gelagert. Das in dem Milzgewebe enthaltene Amyloid wurde mit Hilfe des Polarisationsmikroskopes nach Färbung mit Kongorot nachgewiesen. Das gefärbte Amyloid zeigt dabei Doppelbrechung und ein Aufleuchten in einer grünen anomalen Farbe (16).

Die tiefgefrorene Milz wurde aufgetaut, mit einem Skalpell in grobe Stücke geschnitten und mit einem ULTRA TURRAX-Homogenisator zerkleinert. Dazu wurden 2 ml einer kalten 0,85 %igen NaCl-Lösung je Gramm des amyloidbeladenen Gewebes zugesetzt und anschließend ca 10 Minuten homogenisiert, bis keine groben Gewebsteilchen mehr zu erkennen waren.

In einer gekühlten (0 °C) Sorvall RC-2 Zentrifuge (SS-34 Rotor) wurde das Homogenat bei 12 000 x g (10 000 r.p.m.) 30 Minuten zentrifugiert. Im Sediment konnten deutlich zwei Schichten unterschieden werden, die getrennt und mit 0,85 %iger NaCl-Lösung ausgewaschen wurden. Die getrennten Schichten (Ober- und Unterschicht) wurden wiederum bei 0 °C 30 Minuten zentrifugiert. Dabei zeigte die Unterschicht, von der zuvor die Oberschicht mit einem Spatel vorsichtig abgetrennt worden war, erneut eine Zweischichtung. Die oberste Schicht wurde mit dem Spatel abgehoben und der Oberschicht zugefügt. Der ganze Vorgang wurde 6 mal wiederholt, bis der vorher rot gefärbte Überstand klar erschien.

Die Oberschicht wurde ca 12 Stunden in einem Dialysierschlauch gegen entmineralisiertes Wasser dialysiert, um die

zurückgebliebene NaCl-Lösung zu entfernen. Dabei wurde das Wasser mehrmals erneuert. Die NaCl-freie Oberschicht wurde dann lyophilisiert. Wir erhielten dadurch eine gelbliche Substanz. (=rohe Amyloidfibrillen).

2. Reinigung der rohen Amyloidfibrillen

Die Reinigung der rohen Amyloidfibrillen erfolgte nach der von COHEN und SHIRAHAMA (3) ausgearbeiteten Methode mittels Zuckergradienten (Saccharose).

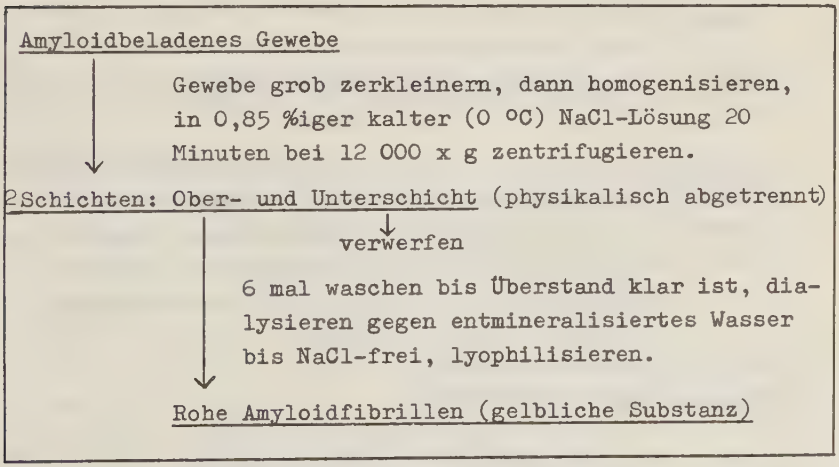
Ein Gramm,in der oben angegebenen Weise erhaltener, lyophilisierter Amyloidfibrillen wurde in 20 ml 60 %iger (1,75 m) Saccaroselösung suspendiert und dann in einer gekühlten (0 °C) Sorvall RC-2 Zentrifuge bei 18 800 x g (12 500 r.p.m.) 15 Minuten zentrifugiert. Das Sediment wurde zurückbehalten, während der Überstand einschließlich einiger grober obenschwimmender Teilchen verworfen wurde.

Das in 10 ml einer 85 %igen (2,49 m) Saccharoselösung gründlich suspendierte Sediment wurde mit 20 ml einer 70 %igen (2,05 m) Saccharoselösung vorsichtig überschichtet.
Die sich ergebenden Schichten wurden 1 Stunde bei 18 800 x g (12 500 r.p.m.) und einer Temperatur von 0 °C zentrifugiert. Wir erhielten ein homogenes Sediment mit einem sehr dünnen weißlichen und einem unter diesem liegenden dunkelbraunen Belag.
Das homogene Sediment wurde in 10 ml einer 85 %igen (2,49 m) Saccharoselösung suspendiert, über die vorsichtig 20 ml einer 75 %igen (2,20 m) Saccharoselösung geschichtet wurde. Die sich ergebenden Schichten wurden wiederum bei 18 800 x g (12 500 r.p.m.) und 0 °C eine Stunde lang zentrifugiert. Dabei erhielten wir wieder ein homogenes Sediment mit geringen oberflächlichen Verunreigigungen, die entfernt wurden, während die homogene Substanz in 10 ml einer 85 %igen Saccharoselösung über die 20 ml einer 80 %igen (2,34 m)

Saccharoselösung geschichtet wurde, suspendiert wurde. Einstündiges Zentrifugieren bei 18 800 x g (12 500 r.p.m.) und 0 °C ergab ein homogenes Sediment, dessen sehr dünner Belag, von dem oben angegebenem Aussehen, wieder entfernt wurde.

Die homogene Substanz wurde in 40 ml entmineralisiertem Wasser suspendiert und bei 39 100 x g (18 000 r.p.m.) 30 Minuten zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde 3 mal wiederholt. Anschließend wurde das Sediment gegen entmineralisiertes Wasser dialysiert bis es saccharosefrei war (ca 72 Stunden). Eine negative Molisch-Probe bewies die Zuckerfreiheit.

Der Inhalt des Dialysierschlauches wurde bei 39 100 x g 30 Minuten zentrifugiert und das resultierende Sediment lyophilisiert.



Tab. I: Schema zur Gewinnung der rohen Amyloidfibrillen aus einer amyloidbeladenen Milz.

Lyophilisierte rohe Amyloidfibrillen

↓ 1 g in 20 ml 60 %iger Saccharoselösung suspendieren und 15 Minuten zentrifugieren bei 12 500 r.p.m.

Sediment in 10 ml 85 %iger Saccharoselösung suspendieren, vorsichtig überschichten mit 20 ml 70 %iger Saccharoselösung, 1 Stunde zentrifugieren bei 12 500 r.p.m.

1. Stufe

↓

Sediment in 10 ml 85 %iger Saccharoselösung suspendieren, überschichten mit 20 ml 75 %iger Saccharoselösung, 1 Stunde zentrifugieren bei 12 500 r.p.m.

2. Stufe

↓

Sediment in 10 ml 85 %iger Saccharoselösung suspendieren, überschichten mit 20ml 80 %iger Saccharoselösung, 1 Stunde zentrifugieren bei 12 500 r.p.m.

3. Stufe

↓

Sediment in 40 ml entmineralisiertem Wasser bei 18 800 r.p.m. zentrifugieren, 3 mal wiederholen, dialysieren gegen entmineralisiertes Wasser, bis saccharosefrei (Molisch-Probe). Suspension 30 Minuten bei 18 000 r.p.m. zentrifugieren, Sediment lyophilisieren.

↓

Gereinigte Amyloidfibrillen

Tab. II: Schema zur Reinigung der rohen Amyloidfibrillen im Zuckergradienten.

3. Angewandte Methoden zur Prüfung der Amyloidfibrillen auf Reinheit

a) Polarisationsmikroskopie:

Gereinigte Amyloidfibrillen wurden in 0,5 %iger wässriger Kongorotlösung aufgenommen und auf einen Objektträger gebracht. Die Betrachtung der so präparierten Amyloidfibrillen erfolgte im Polarisationsmikroskop (Leitz Biopol) zwischen gekreuzten Polars.

b) Elektronenmikroskopie:

Das Amyloid wurde in Kunststoff (Vestopal) eingebettet und mit einem Ultramikrotom OM U 2 der Firma Reichert geschnitten.
Die Aufnahmen wurden mit dem Elektronenmikroskop EM 9 der Firma Carl Zeiss, Oberkochen, angefertigt.

4. Weitere Verwendung der gereinigten Amyloidfibrillen

a) Klinische Untersuchung:

Ein Teil der gereinigten und in der oben angegebenen Weise auf Reinheit geprüften Amyloidfibrillen wurden freundlicherweise von den Behringwerken gassterilisiert und in Ampullen zu je 5 mg Amyloid abgefüllt. Unmittelbar vor Gebrauch wurde der Inhalt einer Ampulle in 1 ml steriler physiologischer NaCl-Lösung suspendiert. Zum Zerkleinern größerer Amyloidklümpchen wurde die Lösung mehrmals durch eine Injektionsnadel gepreßt.
Die Amyloidsuspension wurde dem Patienten bzw. der Testperson in einer Menge von 0,1 ml Suspension (= 0,5 mg Amyloid) in einer Tuberkulinspritze intracutan in den Unterarm injiziert. Zur Kontrolle wurde eine Quaddel mit physiologischer NaCl-Lösung gesetzt. Am 1., 2., 3. und 10. Tag sahen wir an den markierten Einspritzstellen nach Reaktionen.

b) Biochemische Untersuchungen:

aa) Aminosäurenanalyse

Die Aminosäurenanalysen wurden mit einem automatischen Aminosäurenanalysator "Unichrom" der Firma Beckman (24) durchgeführt.
Die Proteinproben wurden 24 Stunden in 6 n-HCl bei 110 °C in evakuierten abgeschmolzenen Glasröhren hydrolysiert.
Zur Bestimmung von Cystein als Cysteinsäure wurde die Probe der Hydrolyse mit Perameisensäure oxydiert.

bb) Behandlung der Amyloidfibrillen mit Kollagenase und anschließender Aminosäurenanalyse des Sedimentes und des Überstandes:

50 mg Amyloid wurden mit 10 ml TRIS-HCl Puffer (pH 7,3) (0,1 m Trispuffer/0,01 m Calciumazetat) und 2 mg Kollagenase (Clostridiopeptidase A) versetzt und 24 Stunden bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Das Gemisch wurde dann 10 Minuten bei 10 000 r.p.m. in einer Sorvall RC-2 Zentrifuge zentrifugiert, 2 mal mit der oben genannten Pufferlösung und abschließend mit entmineralisiertem Wasser gewaschen, wobei nach jedem Reinigungsschritt 10 Minuten bei 10 000 r.p.m. zentrifugiert wurde.
Der Aminosäurengehalt des Sedimentes und des Überstandes wurde durch Aminosäurenanalysen bestimmt.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

1. Prüfung des Amyloidgehaltes der Ober- und Unterschicht

Die nach Homogenisieren des amyloidhaltigen Milzgewebes und anschließendem Zentrifugieren erhaltenen zwei Schichten (Ober- und Unterschicht) (Tab. I u.II) wurden nach Färbung mit Kongorot im Polarisationsmikroskop auf ihren Amyloidgehalt untersucht. Die homogenere Oberschicht war amyloidreicher und enthielt nur geringe Verunreinigungen, während die Unterschicht derbe Gewebsreste, Fasern und Zelldetritus aufwies, aber auch noch verhältnismäßig viel Amyloid erkennen ließ.

2. Prüfung der Reinigungsschritte des Amyloids im Zuckergradienten

Im Gegensatz zu COHEN (3), der bei den 3 Stufen der Zuckergradientenreinigung je 3 Schichten erhielt (eine oberste mit groben -coarse- Teilchen, eine mittlere mit glatten -smooth- und einem Bodensatz mit sehr groben -very coarse- Teilchen) von denen er jeweils die mittlere isolierte und weiterverarbeitete, ergab sich bei uns nur eine homogene Schicht mit einem sehr dünnen weißlichen und einem unter diesem liegenden, noch dünneren dunkelbraunen Belag.

Dieser Belag wurde vorsichtig abgekratzt und nach Kongorotfärbung im Polarisationsmikroskop untersucht.

Neben grün aufleuchtendem Amyloid waren zahlreiche nicht grün aufleuchtende kleine Teilchen zu erkennen, bei denen es sich wahrscheinlich um Zelldetritus handelte.

Proben aus verschiedenen Höhen der homogenen Schicht zeigten ausschließlich grünes Aufleuchten.

Die Weiterbehandlung dieser Schicht ergab eine weiß-gelb aus-

sehende, sehr leichte und lockere Substanz.
Bei allen klinischen und biochemischen Untersuchungen wurde von diesem Stoff ausgegangen.

3. Problematik der Reinheit der Amyloidfibrillen und Vergleich der Aminosäurenanalyse verschiedener Autoren mit den eigenen Werten

Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen der von uns gereinigten Amyloidfibrillen lassen die fibrilläre Struktur des Amyloids erkennen und sind offensichtlich frei von Verunreinigungen. COHEN (3) weist aber darauf hin, daß man Substanzen, die fest an die Fibrillen adsorbiert sind, nicht ausschließen kann. Selbstverständlich gilt dies aber nur für Substanzen, die mit dem Auflösungsvermögen des Elektronenmikroskops nicht erkannt werden können, wie z.B. Globuline.

Es ist bekannt, daß das intra vitam dauernd vom Blutplasma durchströmte Amyloid verschiedene Substanzen (Polysaccharide, Serumeiweißkörper, Lipide, Eisen) aus dem Plasma binden kann, wodurch sich auch das färberische Verhalten des Amyloids ändern kann (18). Hierdurch wird auch erklärt, daß HOROWITZ und Mitarbeiter (7) 1965 im Amyloid eines Patienten mit Hyperfibrinogenämie bei familiärer Amyloidose histoserologisch Fibrinogen und nur geringe Mengen Gamma-Globulin nachweisen konnten; sie fanden aber bei einem Patienten mit Gamma-Globulinvermehrung und Amyloidose hauptsächlich Gamma-Globulin und nur geringe Mengen Fibrinogen im Amyloid.

Auch gelang der Nachweis von Eisen im Amyloid eines Patienten mit Hämosiderose (MISSMAHL 27). Diese Befunde zeigen alle, daß am Amyloid verschiedenartige im Serum vorkommende Substanzen absorbiert sein können. Diese Absorptionsfähigkeit des Amyloids ist wahrscheinlich, neben der Mitbestimmung von Grundsubstanz und Gewebsresten, ein Grund dafür,

daß bis heute die Zusammensetzung des Amyloids von den einzelnen Autoren verschieden angegeben wird (3), obwohl die elektronenmikroskopischen Befunde den Schluß zulassen, daß zwischen den Amyloiden der verschiedensten Amyloidoseursachen keine Unterschiede in der Fibrillenstruktur bestehen (CAESAR 27). MISSMAHL (18) nimmt deshalb an, daß bezüglich der Feinstruktur alles Amyloid weitgehend identisch ist.

Da die Ergebnisse der Aminosäurenanalysen gereinigter Amyloidfibrillen gut übereinstimmen (Tab. III), können wir annehmen, daß die genannten Absorptionsvorgänge bestimmter Substanzen an Amyloid wahrscheinlich nur das in corpore vorkommende Amyloid, d.h. Amyloidfibrillen einschließlich umgebender Grundsubstanz betreffen.

Aus Tabelle III ist eine gute Übereinstimmung der Aminosäurenzusammensetzung von Amyloidfibrillen, die nach der Methode von COHEN (3) gewonnen wurden, zu erkennen.

Vergleichbare Ergebnisse erhielten auch LETTERER, GEROK und SCHNEIDER (12), trotz Anwendung anderer Verfahren der Amyloidisolierung und Aminosäurenbestimmung.
Die Gewinnung des Amyloids erfolgte bei ihnen durch Pepsinverdauung des amyloidhaltigen Gewebes. Amyloid ist gegen Pepsin resistent, während die übrigen organischen Substanzen zerstört werden.
Die Amyloidproben wurden dann mit 5n HCl durch Kochen hydrolysiert und die erhaltenen Aminosäuren durch 2-dimensionale Papierchromatographie ausreichend getrennt. Quantitative Bestimmung der Aminosäure erfolgte aus den Eluaten der ausgeschnittenen Flecke.
Nicht mit ausreichender Sicherheit konnten Methionin, Cystein und Hydroxyprolin bestimmt werden, da sie häufig nur in geringer Menge vorlagen.
Die Autoren sahen in der Unterschiedlichkeit ihrer Proben einen Beweis für den uneinheitlichen Aufbau des Amyloid-

	Eigene Werte	Cohen(3)	Letterer, Gerok, Schneider(12)				Benditt u. Eriksen (1)
	Milz	Leber	Milz I, Milz II, Niere, Leber				Milz
	Mol%	Residues per 100 000g Protein	Mol%	Mol%	Mol%	Mol%	Residue weight %
Lysin	5,05	59,4	3,8	5,5	4,6	2,9	2,9
Histidin	2,10	18,9					2,6
Ammoniak	8,29						
Arginin	5,82	59,4	7,1	5,9	5,2	4,1	12,2
Asparagins.	9,05	94,6	10,0	8,1	7,4	11,3	13,3
Threonin	3,77	43,2	2,2	5,3	4,5	4,4	0,2
Serin	6,10	63,5	6,3	5,1	4,7	6,5	4,9

eiweißes. Diese Varietät versuchen sie damit zu erklären, daß Amyloid ein Mischkörper aus mindestens 2 Proteinen sei, die sich bei der Amyloidbildung in wechselndem Mengenverhältnis vereinigten. Sie halten eine Anlagerung globulärer Proteine - gemeint sind Globuline - an das Fasernetz fibrillärer Eiweißkörper für möglich.

Mit einer weiteren Aminosäurenanalyse sollte Hydroxyprolin nachgewiesen werden. Die gefundenen Mengen waren aber so gering, daß eine quantitative Angabe nicht möglich war.

4. Ergebnisse der Inkubation der Amyloidfibrillen mit Kollagenase *

Die elektronenmikroskopisch erkennbare fibrilläre Struktur des Amyloids, sowie seine Unlöslichkeit in Wasser lassen eine Verwandtschaft zu den Skleroproteinen vermuten. Eine enge Beziehung des Amyloids zu Kollagen hält COHEN (4) jedoch für unwahrscheinlich. Er versetzte Amyloidfibrillen mit Kollagenase und fand diese nach elektronenmikroskopischer Prüfung unverändert vor. Dabei ist allerdings die Möglichkeit nicht auszuschließen, daß die Kollagenase in dieser Versuchsanordnung das Amyloid nur geringfügig angreift und somit die Fibrillenstruktur elektromikroskopisch unverändert erscheint. Es ist also aus diesen Versuchen nicht unbedingt zu folgern, daß Kollagenase das Amyloid nicht angreifen könne.
Ausschlaggebend für Versuche, Amyloid mit Kollagenase zu inkubieren, war die Frage, ob die von COHEN (3) und uns gefundenen Prolinmengen im Amyloid für eine Verunreinigung des Amyloids durch Kollagenfasern sprechen, oder ob das Prolin einen Bestandteil der Amyloidsubstanz darstellt.

---

* Für Überlassung der Kollagenase (Clostridiopeptidase A) danke ich der Fa. Knoll A.-G. Ludwigshafen am Rhein.

Sollte das gefundene Prolin aus verunreinigendem Kollagen stammen, müßte auch Hydroxyprolin nachweisbar sein, da die häufigsten Aminosäuren im Kollagen Glycin, Prolin und Hydroxyprolin sind, in der folgenden charakteristischen Reihenfolge - X - Gly - Pro - Hydroxypro - X - * (23).

Nach Inkubation von Amyloid mit Kollagenase und Abzentrifugieren des nicht angegriffenen Amyloids fanden wir im Überstand zwar Prolin neben den anderen Aminosäuren, konnten jedoch Hydroxyprolin nicht eindeutig nachweisen (Tab.IV).

Die Aminosäurenzusammensetzung des Überstandes ändert sich durch Hydrolyse mit 6n HCl kaum (Tab. IV) und entspricht im großen und ganzen der von nicht mit Kollagenase behandeltem Amyloid. Der Rückstand zeigt ebenfalls eine ähnliche Aminosäurenzusammensetzung wie unbehandeltes Amyloid, vor allem ist nach wie vor Prolin vorhanden (Tab. IV).

Dieser Befund, sowie das Fehlen von Hydroxyprolin lassen den Schluß zu, daß unser gereinigtes Amyloid frei von Verunreinigungen durch Kollagen ist und demzufolge das Prolin aus der Amyloidsubstanz selbst stammen muß.

Ob die von uns im Überstand nach Kollagenasebehandlung der gereinigten Amyloidfibrillen gefundenen freien Aminosäuren Ausdruck einer Verunreinigung des Fermentes sind, kann nicht gesagt werden.

Die Faserstruktur des Amyolids, seine Doppelbrechung und die Nähe seiner Ablagerung zu Bindegewebszellen, könnten darauf hinweisen, daß Amyloid von Fibroblasten im Sinne einer Dysfunktion dieser Zellen synthetisiert würde. Diesen Fibroblasten wäre somit die Fähigkeit, normales Kollagen zu bilden, verlorengegangen, stattdessen käme es zur Amyloidsynthese.

---

* wobei - X - eine beliebige Aminosäure sein kann.

	Amyloid	Amyloid (Rückstand)	Überstand	Überstand hydrolysiert
Glutaminsäure	5,9	6,8	1,2	4,7
Prolin	2,3	2,1	1,2	3,8
Glycin	5,7	6,2	5,8	7,0
Alanin	4,8	7,8	5,8	5,3
Valin	2,0	1,7	3,0	2,6
Methionin	1,0	1,0	1,0	1,0
Isoleucin	1,6	2,6	2,5	2,2
Leucin	3,5	4,5	3,7	4,6
Tyrosin	1,6	2,2	1,8	1,4
Phenylalanin	2,0	3,4	2,4	3,8

Tab. IV: Aminosäurenzusammensetzung des mit Kollagenase inkubierten Amyloids, des Rückstandes und des Überstandes.

Die angegebenen Werte sind Mol Aminosäuren im Vergleich zu Methionin, das gleich 1 gesetzt wurde.

5. Ergebnisse der klinischen Untersuchung mit Amyloidfibrillen

Die Patienten und Testpersonen wurden in vier Gruppen eingeteilt: (Tabelle V)

Gruppe 1.) Patienten mit generalisierten Amyloidosen.

Gruppe 2.) Patienten, deren Grundkrankheit evtl. zu einer Amyloidose geführt haben könnte.

Gruppe 3.) Patienten, bei deren Grundkrankheit das Auftreten einer Amyloidose unwahrscheinlich war.

Gruppe 4.) Gesunde Testpersonen.

Leider war es nicht möglich evtl. bestehende Amyloidosen der Gruppen 2 - 4 durch Rectumbiopsie (19) nachzuweisen.

Das Ergebnis der Intracutanspritzung gereinigter Amyloidfibrillen in physiologischer NaCl-Lösung als Suspension erlaubt keine signifikanten Aussagen über eine Reaktion auf Fremdamyloid bei Amyloidkranken, Patienten mit anderen Krankheiten und Gesunden, d.h. selbst Amyloidkranke tolerieren Fremdamyloid und empfinden es nicht als Antigen.

Der positive Ausfall des Testes bei Nr. 8 und 9 der Gruppe 4 läßt sich wahrscheinlich auf einen technischen Fehler zurückführen. Diese Personen erhielten versehentlich eine etwas größere Amyloiddosis.

Da das Amyloid in physiologischer NaCl-Lösung nicht gelöst, sondern als Suspension vorliegt, besteht die Möglichkeit, daß die positiven oder schwach positiven Reaktionen nicht als immunologische Erscheinungen, sondern als unspezifische Fremdkörperreize bei besonders empfindlichen Personen aufzufassen sind.

	Nr.	Name	Geb.Datum	Geschl.	Diagnose	Hautreaktionen 1	2	3	10.Tag
Gruppe 1	1	E.M.	5.11.11.	w	M.Bechterew - sekundäre Amyloidose	ø	ø	ø	ø
	2	R.M.	27. 7.37	m	pericolagene Amyloidose (kardiopathische Form)	ø	ø	ø	ø
Gruppe 2	1	E.H.	15.11.42	m	M. Hodgkin	ø	ø	ø	ø
	2	W.W.	20. 9.47	m	M. Hodgkin	ø	-	-	ø
	3	A.A.	15,11.28	m	Brill-Symmers Syndrom	ø	ø	ø	ø
	4	H.G.	17.12.27	m	M. Boeck	ø	ø	ø	ø
	5	P.S.	30. 8.23	w	rheumatoide Arthritis	ø	ø	ø	ø
	6	J.P.	14. 2.09	m	Plasmocytom	(+)	(+)	ø	ø
	7	K.M.	4. 9.10	m	Plasmocytom	+	(+)	ø	ø
Gruppe 3	1	H.M.	1. 7.23	m	Herzinfarkt	ø	(+)	ø	ø
	2	W.K.	21. 2.08	m	Angina pectoris	ø	ø	ø	-
	3	J.P.	17.12.21	m	M. Bang, Lambliasis	ø	(+)	ø	ø
	4	K.S.	12.08.07	m	Herzinfarkt	ø	ø	ø	ø
	5	W.S.	14, 9.06	m	Herzinfarkt	ø	ø	ø	ø
	6	F.G.	13. 7.11	m	Herzinfarkt	(+)	(+)	ø	-
	7	L.W.	16. 7.12	w	Herzinfarkt	+	(+)	ø	ø
	8	E.B.	18. 3.16	m	Herzinfarkt, Pericarditis	(+)	(+)	ø	ø
	9	A.D.	21. 5.30	m	chron. Glomerulonephritis	ø	ø	ø	ø
	10	F.B.	21. 5.14	m	chron. Pyelonephritis	ø	-	ø	ø
	11	E.L.	31. 5.10	m	chron. Pyelonephritis	(+)	ø	ø	ø
	12	K.R.	8. 7.07	m	Chron. Niereninsuffizienz, Hyperparathyreoidismus	ø	ø	ø	ø
	13	E.K.	8. 5.10	m	Bronchialneoplasma	(+)	ø	ø	-
	14	R.W.	3. 6.35	w	Staphylokokkensepsis	ø	(+)	ø	ø
	15	S.A.	23. 4.39	m	Myocarditis	+	+	(+)	ø
	16	G.B.	23.10.04	m	chron. Pneumonie	(+)	(+)	-	ø
	17	K.S.	8. 2.93	w	chron. Pyelonephritis	ø	-	ø	ø
	18	A.P.	24. 1.22	m	Pneumonie, Herzdekompensation	ø	ø	ø	ø
	19	K.H.	10. 7.16	m	Zustand nach apoplektischem Insult	(+)	ø	ø	ø
	20	G.S.	29. 8.09	m	Polyposis coli, Ulcus ventriculi	ø	ø	ø	ø
	21	F.S.	16. 6.27	m	paroxysmale Tachycardie	(+)	ø	ø	ø
	22	G.W.	12. 9.38	m	fragliche Pyelonephritis mit latenter Insuffizienz	+	(+)	-	ø
	23	N.D.	5.2. 41	m	Ulcus duodeni	-	ø	ø	ø
	24	N.T.	15. 4.34	m	Zustand nach Ulcus ventriculi	ø	ø	ø	ø
	25	H.O.	22. 8.37	m	Diabetes mellitus,Coma diabeticum	ø	ø	ø	ø
	26	L.R.	12. 2.00	w	Zustand nach Ablatio mammae mit Recidiv und Metastasen	ø	-	ø	ø

Tab. V: Hautreaktionen nach intrakutaner Injektion von 0,1 ml Amyloidsuspension.

Fortsetzung S. - 23 -

	Nr.	Name	Geb.Datum	Geschl.	Hautreaktionen 1	2	3	10.Tag
Gruppe 4	1	HP. M.	16. 5.20	m	Ø	Ø	Ø	+
	2	J.H.	25. 3.44	m	Ø	Ø	Ø	Ø
	3	F.M.	17. 1.48	m	Ø	Ø	Ø	Ø
	4	H.M.	24. 9.43	m	Ø	Ø	Ø	Ø
	5	D.U.	07.11.43	m	Ø	Ø	Ø	Ø
	6	H.E.	17.10.46	m	Ø	Ø	Ø	Ø
	7	S.P.	03.10.46	m	Ø	Ø	Ø	Ø
	8	J.E.	03.12.46	m	Ø	Ø	Ø	Ø
	9	H.D.	27. 7.45	m	+	+	(+)	Ø
	10	G.S.	07. 3.47	m	+	(+)	(+)	Ø
	11	C.K.	16. 5.46	w	(+)	Ø	Ø	Ø
	12	V.R.	15. 6.50	w	Ø	Ø	Ø	Ø
	13	A.R.	15.12.49	w	(+)	Ø	Ø	Ø
	14	M.K.	11. 3.46	w	Ø	Ø	Ø	Ø
	15	C.R.	21. 2.49	w	Ø	Ø	Ø	Ø
	16	E.S.	26. 9.49	w	Ø	Ø	Ø	Ø
	17	R.S.	31. 7.48	w	Ø	Ø	Ø	Ø
	18	M.E.	22.11.45	w	Ø	Ø	Ø	Ø
	19	H.E.	30. 3.47	w	Ø	Ø	Ø	Ø

Fortsetzung
Tab. V: Hautreaktionen nach intrakutaner Injektion von 0,1 ml Amyloidsuspension.

m = männlich, w = weiblich.

Ø = keine Reaktion feststellbar.

(+) = schwach positive Reaktion: Rötung und Schwellung eines Hautbezirkes vom Durchmesser 2 - 4 mm.

+ = positive Reaktion: Rötung und Schwellung eines Hautbezirkes vom Durchmesser 4 - 10 mm

IV. ZUSAMMENFASSUNG

1. Es wurden Amyloidfibrillen aus einer amyloidhaltigen Milz dargestellt und in einem Saccharose-Zucker-Gradienten gereinigt.

2. Prüfung der Amyloidfibrillen auf Reinheit erfolgte mit Hilfe der Polarisations- und Elektronenmikroskopie.

3. Die Aminosäurenzusammensetzung der Amyloidsubstanz wurde durch eine Aminosäurenanalyse bestimmt und die gefundenen Werte mit denen anderer Autoren verglichen (Tab. III).

4. Vermutete Verunreinigungen durch Kollagen sollten durch Inkubation des Amyloids mit Kollagenase (Clostridiopeptidase A) aus diesem durch Fermenteinwirkung entfernt und im Überstand nachgewiesen werden. Die Aminosäurenzusammensetzung des Überstandes entsprach aber etwa derjenigen des Rückstandes und des Amyloids, d.h. die in Kollagen besonders reichlich enthaltenen Aminosäuren Glycin, Prolin und Hydroxyprolin waren im Überstand nicht vermehrt vorhanden (Tab. IV).

5. Durch eine besondere Aminosäurenanalyse sollte Hydroxyprolin nachgewiesen werden. Dieses konnte aber nicht mit Sicherheit bestimmt werden. Punkt 4 und 5 lassen vermuten, daß das von uns dargestellte und gereinigte Amyloid nicht durch Kollagen verunreinigt war.

6. Intracutane Injektion einer Amyloidsuspension in 0,9 %iger NaCl-Lösung zeigte, daß Gesunde und Amyloidkranke Amyloid nicht als fremd empfinden (Tab. V).

V. LITERATURVERZEICHNIS

1. BENDITT, E.P. and N.ERIKSEN: A protein related to the subunit structure of human amyloid fibrills. Proc.nat.Acad.Sci. 55, 308-316 (1966).

2. BENDITT, E.P., D. LAGUNOFF, N. ERIKSEN and O.A. ISERI: Amyloid.Extraction and preliminary characterization of some proteins. Arch.Path.(Chicago) 74,323-330 (1962).

3. COHEN, A.S.: Preliminary chemical analysis of partially purified amyloid fibrills. Lab.invest. 15, 66-83 (1966).

4. COHEN, A.S. and E. CALKINS: The isolation of amyloid fibrills and a study of the effect of collagenase and hyaluronidase. J.cell.biol. 21, 481-486 (1964).

5. COHEN, A.S. and E. CALKINS: Electron microscopic observations on a fibrous component in amyloid of diverse origins. Nature 183, 1202 (1959).

6. FRIEDREICH, N. und A. KEKULE: Zur Amyloidfrage. Vir.Arch.path.Anat. 16, 50 (1859).

7. HOROWITZ, R.E., V.W.STUYVESANT, W. WIGMORE and D. TATTER: Fibrinogen as a component of amyloid. Arch.Path. 79, 238-244 (1965).

8. KRAWKOW, N.P.: Beiträge zur Chemie der Amyloidentartung. Arch.exper.Path.Pharm. 40,195-220(1898).

9. KÜHNE, W. und RUDNEFF: Zur Chemie der amyloiden Gewebsentartung. Virch.Arch.path.Anat. 33, 66 (1865).

10. LETTERER, E.: Studien über Art und Entstehung des Amyloids. Beitr.path.Anat. 75, 486-588 (1926).

11. LETTERER, E.: Neue Untersuchungen über die Entstehung des Amyloids. Virch.Arch.path.Anat.293, 34-72(1934).

12. LETTERER, E,, W. GEROK und G. SCHNEIDER: Vergleichende Untersuchungen über den Aminosäurenbestand von Serumeiweiß, Lebereiweiß, Amyloid, Hyalin u.Kollagen. Virch.Arch.path.Anat.327,327-342(1955).

13. LINKE, R.: Das Parabioseexperiment und seine Anwendung zur Klärung einiger Fragen der Amyloid-Pathogenese. Med.Diss., Tübg. (1966).

14. LOESCHKE, H.: Vorstellungen über das Wesen von Hyalin und Amyloid auf Grund von serologischen Versuchen. Beitr.path.Anat. 77, 231-239 (1927).

15. MISSMAHL,H.P.: Welche Beziehungen bestehen zwischen den verschiedenen Formen der Amyloidose und den Bindegewebsfasern. Verh.Dtsch.Ges.Inn.Med.65, 439-442 (1959).

16. MISSMAHL,H.P.: Die Beeinflussung des polarisierten Lichtes durch die Amyloidsubstanz. Ann.Histochim.Suppl. 2, 225-234 (1962).

17. MISSMAHL, H.P.: Amyloidose: Klinik, Therapie, Prognose. Fortschritte d.Med. 85, 621-625 (1967).

18. MISSMAHL, H.P.: Amyloidosis. In: MIESCHER, P.A. u.H.J. MÜLLER-EBERHARD: Textbook of Immunpathology Vol. II, 421-434. Grune & Stratton New York and London 1969.

19. MISSMAHL, H.P.: Rectumbiopsie zum Nachweis der Amyloidose. Dtsch. Med.Wschr. 88, 1783-1785 (1963).

2o. ODDI, R.: Über das Vorkommen von Chondroitinschwefelsäure in der Amyloidleber. Arch.exp.Path.Pharm. 33, 367-388 (1894).

21.PIRANI, C.L.: A.BESTETTI, H.R.CATCHPOLE and M.MESKAUSKAS: Isolation and characterization of amyloid. Arthritis and Rheum. 7. 338 (1964).

22. RANLØV, P. and E.JENSEN: Homograft reaction in amyloidotic mice. Acta path.et.micro.biol.scand. 68, 19 (1966).

23. RÖMPP, H.: Chemie Lexikon 6. Aufl. 1966 Frankh'sche Verlagshandlung Stuttgart.

24. SPACKMAN,W.H., H. STEIN and S. MOORE: Anal. Chem. 3o, 119o (1958).

25. TEILUM, G.: Pathogenesis of amyloidosis, The two-phase cellular theory of local secretion. Acta Path. Microbiol. Scand. 61, 21-45 (1964)

26. VIRCHOW, R.: Über eine im Gehirn und Rückenmark aufgefundene Substanz mit der chemischen Reaktion der Cellulose. Virch.Arch.path.Anat. 6, 135-138(1853).

27. BRUNS, G., W. ZSCHIESCHE und S. FRITSCH: Fortschritte der Amyolidforschung. Nova Acta Leopoldina 31,(1966) Colloquium in Halle/S. 23.8.1964.

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr. H.E. Bock, dem Direktor der Medizinischen Universitätsklinik Tübingen, für die Möglichkeit, an seiner Klinik meine Dissertation zu verfassen.

Besonders danke ich meinem Doktorvater, Herrn Professor Dr. H.P. Mißmahl für die Überlassung des Themas sowie die Hilfe und Unterstützung bei der Durchführung meiner Doktorarbeit.

Die Aminosäurenanalysen wurden von Herrn Dr. H.P. Hagenmaier und die elektronenmikroskopischen Aufnahmen von Herrn Dr. Waldeck angefertigt, wofür ich beiden Herren danke.

Lebenslauf

Am 7. November 1943 wurde ich, Dieter Ulitzsch, als Sohn des Facharztes Dr.med., Dr.med.dent. K.A. Ulitzsch und seiner Ehefrau Sybille, geborene Hartmann, in Halle an der Saale geboren.

Meine Schulzeit absolvierte ich in Apolda/Thüringen, Miltenberg/Main und Schwenningen/Neckar, wo ich 1963 die Reifeprüfung ablegte.

Im Frühjahr 1963 begann ich in Tübingen Medizin zu studieren. Nach dem 1966 bestandenen Physikum studierte ich je ein Semester an der Universität Kiel und Wien und kehrte 1967 nach Tübingen zurück, wo ich am 31. Juli 1969 das medizinische Staatsexamen bestand.